

## Rapport d'activités n°1

*Etude de la mise en oeuvre  
de bactéries lactiques amylolytiques  
pour le développement de boissons  
amylacées fermentées*

Patrice BILLARD  
Nov.94-Mai 95

Rapport d'activités n°1

*Etude de la mise en oeuvre  
de bactéries lactiques amylolytiques  
pour le développement de boissons  
amylacées fermentées*

Patrice BILLARD  
Nov.94-Mai 95

Resumé ?

<b>1-Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>2-Matériels et méthodes.....</b>	<b>3</b>
2-1-Milieus de cultures et de conservations.....	3
2-2-Recherche des souches hétérofermentaires.....	3
2-2-1-Observation du gaz produit.....	3
2-2-2-Mesure de l'éthanol et de l'acide acétique.....	4
2-2-3-Prise du pH.....	4
2-3-Cinétique d'acidification et de consommation de l'amidon au cours des fermentations des souches.....	4
2-3-1-Cinétique d'acidification.....	5
2-3-2-Cinétique de consommation d'amidon.....	5
2-4-Mesure de l'activité amylolytique.....	5
2-5-Identification des souches.....	6
<b>3-Résultats et discussion.....</b>	<b>7</b>
3-1-Prise en charge du souchier CIAT.....	7
3-2-Elimination des souches hétérofermentaires et peu acidifiantes.....	7
3-2-1-Conclusion.....	8
3-3-Cinétique d'acidification et de consommation de l'amidon au cours des fermentations.....	9
3-3-1-Conclusion.....	10
3-4-Mesure des potentiels amylolytiques.....	11
3-4-1-Conclusion.....	12
3-5-Identification taxonomique.....	13
<b>4-Conclusion générale.....</b>	<b>14</b>
<i>Bibliographie.....</i>	<i>16</i>

# *Introduction*

## 1-Introduction:

Le CIRAD-SAR de Montpellier propose dans le cadre d'un "projet manioc" de réaliser une boisson fermentée afin de compléter une alimentation pauvre en produits laitiers dans la majorité des pays sud-américains. L'abondance du manioc dans ces pays, notamment en Colombie et au Brésil, explique le choix de ce tubercule comme élément principal de la boisson. Cette dernière devrait être du type "yaourt à boire" et avoir des caractères nutritifs. Elle sera destinée à toutes les classes d'âges des milieux urbains.

Le développement d'une telle boisson passe par celui d'une étape de fermentation lactique de l'amidon de manioc.

Les principaux objectifs de cette étape sont:

- de produire suffisamment d'acide lactique pour assurer une conservation convenable du produit final,
- de développer des arômes proches de ceux rencontrés dans les produits laitiers fermentés,
- éventuellement, d'assurer un effet probiotique par la biomasse bactérienne produite.

A priori, deux voies technologiques pourraient être envisagées:

Voie 1: fermentation directe de l'amidon gélatinisé. Cette voie implique la mise en oeuvre de bactéries lactiques capables à la fois d'hydrolyser l'amidon et de fermenter les produits d'hydrolyse.

Voie 2: hydrolyse préalable de l'amidon suivie d'une fermentation lactique des produits d'hydrolyse. Le spectre des souches pouvant être utilisées par cette voie sera d'autant plus large que l'hydrolyse aura été poussée plus loin.

Une collection de 54 souches "lactiques amylolytiques" nous a été transmise par l'INRA (P. TAILLEZ, Station de Recherches Laitières, Jouy en Josas). Ces souches ont été isolées en Colombie par le CIAT à partir de fermentations locales d'amidon aigre.

Leur potentiel amylolytique pourrait les qualifier pleinement pour une utilisation suivant la voie 1, mais également suivant la voie 2 dans la mesure où l'on s'arrêterait à une simple liquéfaction ou à une hydrolyse partielle de l'amidon.

Ce rapport d'activité présente les résultats de l'étude effectuée pour caractériser les souches de la collection du CIAT et y sélectionner les plus aptes à une utilisation industrielle.

Cette étude a été effectuée en cultivant chaque souche en milieu liquide sur amidon soluble comme source principale d'hydrate de carbone.



Les critères de caractérisation pris en compte ont été:

- le type de fermentation mis en oeuvre (homo- ou hétérolactique),
- la vitesse et l'importance de l'acidification,
- la vitesse de consommation de l'amidon,
- le potentiel amylolytique.

Les quelques souches qui ont répondu le mieux à ces critères de sélection ont été identifiées par galeries API 50 CHL.

Nous joignons à ce rapport d'activité, le rapport d'une étude réalisée par quatre élèves ingénieurs: Melle Catherine ARCHIERI, Melle Christel DEPIENNE, Melle Guenhaël LE BOURHIS, Melle Fabienne VAYLET de l'institut National Agronomique. Le travail est une réflexion sur les critères d'aspect, de composition, d'organoleptique que la boisson devrait présenter. Ces propositions s'appuient sur les habitudes alimentaires, les éventuelles carences nutritionnelles, les ressources disponibles des différents pays sud-américains, décrits dans la littérature ou communiqués par des colombiens.

*Matériels  
et  
méthodes*

## **2-Matériels et méthodes:**

### **2-1-Milieux de cultures et de conservations:**

Les bactéries lactiques sont cultivées sur milieu MRS (DE MAN *et al.*, 1960). La source d'hydrate de carbone est remplacée par de l'amidon soluble (OSI, réf. A 472 5351) dont on ne connaît pas l'origine botanique. Du calcium sous forme de chlorure de calcium est ajouté à raison de 0,05 g/l comme cofacteur des amylases. Le Tween 80 n'est pas utilisé. Pour 1L d'eau permutée, le milieu MRS-amidon est préparé comme tel:

-Peptone pancréatique de caséine	10g
-Extrait de viande	10g
-Extrait de levures	5g
-Amidon soluble	20g
-Hydrogènocitrate de di-ammonium	2,17g
-Acétate de sodium, 3 H <sub>2</sub> O	5g
-Sulfate de magnésium, 7 H <sub>2</sub> O	0,207g
-Sulfate de manganèse, H <sub>2</sub> O	0,056g
-Hydrogènoposphate de potassium, 3H <sub>2</sub> O	2,62g
-Chlorure de calcium, 2H <sub>2</sub> O	0,05g

Le milieu de culture MRS-amidon gélosé est obtenu par ajout de 15g/l d'agar. Le milieu de culture est autoclavé à 120°C pendant 20 minutes.

Les bactéries lactiques sont conservées dans un mélange de milieu MRS-amidon non fermenté et Glycérol (2/1).

### **2-2-Recherche des souches hétérofermentaires:**

Pour chaque souche, 2 tubes à vis hermétiques (duplication des essais) contenant chacun 9 ml de milieu MRS amidon soluble à 20 g/l et une cloche de Durham sont préparés et stérilisés. Les 2 tubes sont ensuite inoculés par 1 ml de suspension bactérienne chacun. Les densités optiques de ces suspensions sont préalablement ajustées à 1, à 620 nm, dans de l'eau physiologique pour permettre la comparaison des résultats des fermentations des différentes souches. Après 18 heures de fermentation à 30 °C, des échantillons sont prélevés pour la lecture des caractères hétérofermentaires et les mesures de pH.

#### **2-2-1-Observation du gaz produit:**

La formation de gaz pendant une fermentation hétérofermentaire doit se traduire



par la présence d'une bulle de gaz dans la cloche de Durham, voire par le soulèvement de cette dernière.

### **2-2-2-Mesure de l'éthanol et de l'acide acétique:**

La chromatographie liquide haute performance (CLHP) est choisie pour mesurer ces deux produits métaboliques.

La chaîne CLHP utilisée est composée d'une pompe 501 Waters, d'un injecteur UCK Waters, et d'un détecteur réfractomètre différentiel Waters. La colonne est une HPX-87H Biorad, dont la phase stationnaire est une résine de styrène et de sulfonate de divinyl benzène, échangeuse d'ion. Cette colonne est protégée par une micro-colonne dont la phase stationnaire est de même nature.

Les échantillons sont préparés comme tel:

2 ml de bouillons fermentés sont prélevés par tubes, puis centrifugés à 5000 rpm et filtrés sur filtre OSI en ester de cellulose de 0,22  $\mu\text{m}$  de porosité. Ces deux dernières opérations éliminent les bactéries et les produits qui ont précipité au cours des fermentations, le risque d'encrasser la colonne CLHP est ainsi diminué.

A ce stade de la manipulation, les échantillons sont congelés, en vue d'une analyse chromatographique globale des échantillons dans une même séance.

Avant l'analyse, les échantillons sont décongelés à la température ambiante et dilués au 1/10 dans l'éluant utilisé pour la CLHP. L'éluant est de l'acide sulfurique 0,006 M. Les injections, de 25  $\mu\text{l}$ , sont faites à température ambiante, le débit de la pompe est de 0,5 ml/min.

### **2-2-3-Prise de pH:**

2 ml de bouillons fermentés supplémentaires sont prélevés par tube. Le pH de ces échantillons est mesuré avec un pH-mètre Knick et une électrode Schott.

### **2-3-Cinétique d'acidification et de consommation de l'amidon au cours des fermentations des souches:**

Les milieux de cultures utilisés sont les mêmes que ceux décrits en 2-1:

9 ml de milieu MRS amidon soluble à 20 g/l par tubes sont inoculés par 1 ml de suspension bactérienne standardisée dans de l'eau physiologique. 6 tubes de milieu de culture par souche sont préparés pour permettre 6 échantillonnages à 0, 2, 4, 7, 11 et 24 heures de fermentation et suivre l'acidification du milieu et la consommation de l'amidon.

### 2-3-1-Cinétique d'acidification:

Cette cinétique n'est pas suivie par la mesure du taux d'acide lactique produit mais par la mesure du pH pour des raisons de facilité de mise en oeuvre et de rapidité. A cet effet, 2 ml de bouillons fermentés sont prélevés, aux temps indiqués ci-dessus, et le pH correspondant est mesuré avec le même matériel décrit en 2-1-3.

### 2-3-2-Cinétique de consommation d'amidon:

L'amidon est dosé selon la méthode de OTENG-GYANG (1979), basée sur la propriété de l'amidon soluble à former en présence de réactif iodo-ioduré, un complexe brun absorbant à 620 nm. Nous mesurons ainsi l'amidon résiduel des échantillons au cours des fermentations. Le dosage de l'amidon "résiduel" permet de calculer par différence, "l'amidon consommé".

La méthode utilisée est résumée dans le tableau 1. Elle nécessite une solution de lugol à 4 %, préparée à partir d'une solution concentrée de KI à 30 g/l et I<sub>2</sub> à 3 g/l, une solution tampon Mc Ilvaine 0,1 M de pH 5,5 et une solution d'amidon soluble à 1,2 % pour la droite étalon. L'échantillonnage, effectué en même temps que celui pour le suivi d'acidification, est ici de 350 µl ou de 700 µl selon la teneur en amidon résiduel.

	Gamme								Echantillon	
Numéro	1	2	3	4	5	6	7	8	/	
Sol. amidon à 1,2 % (ml)	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,7	0,35 (dil 1/2)
Ajout tampon Mc Ilvaine	q.s.p 0,8 ml									
Ajout N H2SO4	0,2 ml pour arrêter l'activité enzymatique									
Prélèvement de 0,1 ml										
Ajout de 2,4 ml de lugol, mesure de la DO immédiatement à 620 nm										

Tab.1: Protocole de mesure de l'amidon résiduel.

### 2-4-Mesure de l'activité amylolytique:

Ce travail est directement lié aux suivis des cinétiques décrites en 2-2. En plus des 2 types d'échantillons recueillis pour chaque suivi, 2 ml supplémentaires sont prélevés par tube, à 4 et 24 heures de fermentation pour la mesure de cette activité. Ces échantillons sont ensuite préparés comme en 2-1-2 (dosage de l'éthanol par CLHP). On obtient ainsi "l'extrait enzymatique".

Le protocole utilisé pour la mesure de cette activité est décrit dans le tableau 2.

La gamme étalon a été préparée comme en 2-2-1.

Volume de l'extrait enzymatique à utiliser: 0,1 ml
Ajout de la solution d'amidon soluble à 1,2%: 0,7 ml
Incubation, à 30°C, pendant 15, 30, 45, 60 minutes
Arrêt de l'action enzymatique par ajout de 0,2 ml d'H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Prélèvement de 0,1 ml
Ajout de 2,4 ml de lugol, mesure de la DO immédiatement à 620 nm.

Tab.2: Protocole de mesure de l'activité amylolytique.

## **2-5-Identifications des souches:**

Les souches retenues sont identifiées avec des galeries API 50 CHL de chez BIOMERIEUX.

*Résultats  
et  
discussion*



### **3-Résultats et discussion:**

#### **3-1-Prise en charge du souchier CIAT:**

Une collection de 54 souches "lactiques amylolytiques" a été constituée en Colombie par le CIAT à partir de fermentations locales d'amidon aigre et nous a été transmise par l'INRA (P. TAILLEZ, Station de Recherche Laitières, Jouy en Josas). Ces souches ont été repiquées sur gélose MRS amidon à l'INAPG. Certaines boîtes ont présenté une hétérogénéité des morphologies coloniales. Les différents types morphologiques ont été purifiés, ce qui a porté à 65 le nombre total de souches de la collection. Les souches ont été ensuite congelées dans du MRS amidon soluble-glycérol (3/1), (voir annexe A1 pour l'appellation des souches). Nous avons effectué une étude de ces 65 souches, basée sur la caractérisation du type de fermentation mis en oeuvre (homo- ou hétérofermentaire), de la vitesse et de l'importance de l'acidification, de la vitesse de consommation de l'amidon, et du potentiel amylolytique, afin d'en sélectionner un petit nombre potentiellement intéressant pour le procédé étudié.

#### **3-2-Elimination des souches hétérofermentaires et peu acidifiantes:**

La première phase de sélection des souches a consisté à éliminer le maximum de souches aux potentiels peu intéressants pour notre projet: souches hétérofermentaires et peu acidifiantes. Une fermentation de 18 heures, par souche, sur MRS amidon soluble a été réalisée pour détecter ces types de souches.

Les bactéries lactiques hétérofermentaires étant caractérisées par leurs productions d'éthanol, de CO<sub>2</sub> et d'acide acétique (WOOD-1961; DOELLE-1969), des cloches de Durham ont donc été placées dans les tubes de fermentation pour tenter de mettre en évidence la production éventuelle de CO<sub>2</sub>. Un échantillon de 10 souches a d'autre part été constitué pour chercher à mesurer l'éthanol et l'acide acétique par CLHP (ces 10 souches ont été choisies de façon à établir un échantillonnage représentatif des différentes valeurs de pH final). Les souches lactiques peu acidifiantes ont été mises en évidence par la mesure de leur pH final.

Après 18 heures de fermentation, nous n'avons observé aucune bulle de CO<sub>2</sub> dans les cloches de Durham. Il semblerait donc que les 65 souches ne soient pas hétérofermentaires. Ces résultats sont confirmés par l'absence d'éthanol en CLHP. (voir résultats en annexe A2). L'acide acétique n'a pas pu être quantifié par CLHP du fait de la quantité importante d'acétate de sodium présent en milieu MRS (l'acétate de sodium est sous sa forme non dissocié lorsqu'il est introduit dans le solvant de CLHP: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,006 M soit un pH de 2,1).



La distribution des souches en fonction de leur pH final, à 18 heures de fermentation (voir résultats en annexe A2), est de type bimodal (voir histogramme en annexe A3). (cette distribution ne contient que 61 souches au lieu de 65 car les souches 50, 52, 52b et 53 n'ont pas présenté de croissance lors de la préparation des inoculum pour la phase 1)

Le groupe de pH le plus élevé (pH de 6 à 6,8) représente 40 % des souches. De tels pH peuvent être dus à de faibles fermentations engendrées par un environnement non adapté à ces souches (mauvaise température, activité de l'eau, concentration des nutriments, pH du milieu, capacité amylolytique, tension d'oxygène...). Les souches de ce groupe n'ont pas été retenues car elles ne sont pas suffisamment acidifiantes.

L'autre groupe comporte des souches plus acidifiantes (pH de 3,8 à 5,4) avec un regroupement majoritaire des pH (70%) entre 3,8 et 4,3. Les souches de ce regroupement ne sont pas susceptibles d'être des souches hétérofermentaires. En effet, ces dernières produisent 1 mole d'acide lactique contre 2 moles pour les souches homofermentaires, par mole de glucose métabolisé (WOOD-1961; DOELLE-1969), leur pH finaux les plus bas ne peuvent donc être que de 4,3-4,5.

Les souches dont les pH finaux ont été supérieurs à 4,3 ont donc été écartées pour diminuer la probabilité de sélectionner des souches hétérofermentaires. Les autres souches de pH finaux compris entre 3,8 et 4,3, sont donc très probablement homofermentaires, ce qui est confirmé par l'absence de production de CO<sub>2</sub> et d'éthanol par ces souches acidifiantes.

Ces dernières souches, au nombre de 26, ont été retenues pour la suite de nos caractérisations. Des hétérogénéités morphologiques de quelques souches ont engendré de nouvelles purifications, ce qui a porté à 30 le lot de souches retenues (les appellations des souches sont en annexe A1).

Nous avons également représenté sur l'histogramme en annexe A3, le caractère ropy relatif à chaque souche. On observe que 50 % du souchier est non ropy, les autres souches présentent des degrés de "ropy" divers. La souche 17.1 se distingue en particulier par le caractère ropy le plus fort. CERNING (1990) et FIGUEROA (1995) attribuent ce caractère à la production d'exopolysaccharides.

### **3-2-1-Conclusion:**

30 souches ont été retenues parmi les 65 de la collection pour leur propriété acidifiante. Ces souches sont présumées homofermentaires. La souche 17.1, a été conservée exceptionnellement pour son fort caractère ropy. L'étape de travail suivante, phase 2, a consisté à mesurer la vitesse et l'importance de l'acidification de ces souches, ainsi que la vitesse de consommation de l'amidon.

### 3-3-Cinétique d'acidification et de consommation de l'amidon au cours des fermentations:

30 souches ont été sélectionnées au cours de la phase 1. Cette deuxième phase a consisté à poursuivre la sélection parmi ces souches, et ce avec le suivi de leurs cinétiques de consommation de l'amidon par dosage colorimétrique, basé sur la complexation iodométrique de l'amidon. Les suivis de ces cinétiques ont été menés en parallèle au cours des fermentations de ces souches sur milieu MRS amidon soluble à 20 g/l, aux temps de 2, 4, 7, 11 et 24 heures.

Ces 30 souches ont été étudiées, à raison de 6 souches par jour, ce qui constitue 5 groupes que l'on nommera par la suite: groupe I, II, III, IV, V. Ces derniers ont été composés aléatoirement.

Pour pouvoir être comparées, les souches ont été caractérisées d'après 4 critères:

- critère 1: Vitesse de consommation d'amidon estimée d'après la vitesse moyenne mesurée entre 4 et 7 heures de fermentation,
- critère 2: Temps nécessaire à la consommation de 10 g/l d'amidon,
- critère 3: Vitesse d'acidification estimée d'après la vitesse moyenne mesurée entre 7 et 11 heures de fermentation,
- critère 4: pH final après 24 heures de fermentation.

Les fermentations de courtes durées, définies par des temps de consommation d'amidon et d'acidification faibles, ont été ainsi particulièrement recherchées car elles représentent des coûts d'investissement plus faibles pour l'industriel et une probabilité d'une contamination bactérienne moindre. Les pH finaux faibles ont été également recherchés car ils sont aussi le gage de contaminations bactériennes réduites.

Les cinétiques d'acidification et de consommation d'amidon obtenues en fonction du temps, pour chaque groupe, sont représentées graphiquement, respectivement en annexes de A4 à A6 et de A7 à A9. Les pH finaux, les temps de consommation de 10 g/l d'amidon et les différentes vitesses moyennes d'acidification ou de consommation d'amidon sont lus et calculés d'après ces cinétiques.

Les résultats de ces calculs sont représentés en annexe A10, et sont volontairement séparés par groupe (I, II, III, IV et V) car les cinétiques d'une journée à une autre journée ne peuvent être raisonnablement comparées.

En effet, la galerie de tubes MRS amidon soluble nécessaire au suivi des cinétiques, a été préparée en une seule fois et l'utilisation de ces tubes s'est espacée dans le temps (étude d'un groupe de 6 souches par jour). Or, jour après jour, on a



observé une précipitation croissante de l'amidon soluble dans les tubes non encore utilisés, malgré le non emploi de tween 80 et un ajout modéré de chlorure de calcium (0,05g/l) comme le préconisent ALAZARD et RAIMBAULT (1994) pour la préparation de tels milieux. Ces auteurs constatent en particulier que l'ajout de chlorure de calcium jusqu'à 0,1 g/l ne fait pas précipiter l'amidon. Il est possible que ce changement d'état de la principale source de carbone puisse perturber les fermentations car la susceptibilité des enzymes excrétées par les bactéries, sur un amidon soluble ou un amidon précipité peut être différente. Cette différence de susceptibilité pourrait ainsi contribuer à des cinétiques différentes d'une journée à une autre, limitant la valeur des comparaisons.

En conséquence, l'estimation du potentiel d'une souche n'a pu se faire qu'au sein d'un même groupe en fonction des niveaux de performances atteints, eux-mêmes jugés d'après les critères définis précédemment. Cette estimation s'est effectuée de la manière suivante:

Pour chaque groupe et chaque critère, les valeurs obtenues ont été divisées en 3 classes d'étendues identiques, lesquelles ont été calculées en fonction de la dispersion des valeurs au sein de ce groupe et de ce critère. Nous avons attribué ensuite à ces classes, des points allant de 1 à 3. Celles contenant les valeurs les plus intéressantes d'après nos critères, ont été assignées aux points maximaux. Chaque souche appartenant à une classe particulière de valeurs, nous avons attribué ainsi un nombre de points aux souches suivant leurs performances. Le cumul des points sur les 4 critères permet d'établir un classement des souches par groupe et de dégager la ou les souches potentiellement les plus intéressantes. Les résultats sont présentés en annexe A11.

6 souches sont apparues ainsi les plus performantes parmi les 30 analysées au départ. Ce sont les souches 20, 60, 25, 6', 15, 9 (voir tableau résumé en annexe A11).

### **3-3-1-Conclusion:**

Les cinétiques d'acidification et de consommation de l'amidon des 30 souches sélectionnées par la phase 1, ont été très proches. Une simple lecture de ces cinétiques étant trop périlleuse à effectuer, nous avons donc procédé à une classification "mathématique" des performances de ces souches. Ce système de sélection a permis de mettre en évidence 6 souches: les n°20, 60, 25, 6', 15 et 9.

Cette sélection peut paraître toutefois draconienne car 6 souches sur 30 sont seulement choisies. Cependant, nous pensons que ce système de choix est valable puisqu'il fait ressortir les souches 20 et 60, déjà observées comme très amylolytiques par FLORES (1992). Les souches étaient alors nommées 120 et 160.

L'étape de travail suivante, phase 3, a consisté à mesurer les potentiels amylolytiques des extraits enzymatiques de ces 6 souches.

### 3-4-Mesure des potentiels amylolytiques:

Dans cette troisième phase de caractérisation, une partie des moûts de chacune de ces fermentations, préparée pour la phase 2, a été centrifugée et filtrée pour obtenir un extrait enzymatique. Pour chaque souche, les extraits ont été préparés à 4 et 24 heures de fermentation.

De plus, nous avons réalisé une nouvelle fermentation pour chacune des 6 souches, mais sur MRS amidon soluble à 30 g./l. Les nouveaux extraits enzymatiques ont été préparés comme précédemment.

Nous avons ainsi constitué 4 extraits enzymatiques par souche: 4V, 24V, 4T, 24T:

4V: extrait issu d'une fermentation à 20 g./l en amidon et âgée de 4 heures,

24V: extrait issu d'une fermentation à 20 g./l en amidon et âgée de 24 heures,

4T: extrait issu d'une fermentation à 30 g./l en amidon et âgée de 4 heures,

24T: extrait issu d'une fermentation à 30 g./l en amidon et âgée de 24 heures.

Le travail de cette phase 3 a donc été de mesurer les potentiels amylolytiques de ces extraits enzymatiques sur amidon soluble à 1,2% dans une solution tampon à pH 5,5. Nous avons suivi ces hydrolyses à 15, 30, 45 et 60 minutes de réaction.

A partir de 15 minutes d'hydrolyse, les activités amylolytiques des extraits enzymatiques au cours du temps se caractérisent par des droites dont les coefficients de corrélation varient de 0,979 à 1 (voir annexes de A12 à A15). L'importance de ces activités dépend des valeurs des pentes de ces droites: de fortes pentes indiquent de fortes activités amylolytiques.

Avant 15 minutes, les prolongements des droites montrent qu'au temps  $t=0$  les activités des extraits sont significatives alors qu'elles devraient être théoriquement nulles. L'activité enzymatique avant 15 minutes ne peut donc pas être caractérisée par une droite mais par une courbe dont l'origine est définie par une activité nulle au temps  $t=0$ , montrant ainsi un mode d'hydrolyse bi-phasique pour les 4 souches.

La première phase comprendrait l'hydrolyse de l'amidon où les chaînes d'amylose et d'amylopectine sont facilement accessibles et plus aisément hydrolysables par les enzymes. La courbe d'activité entre 0 et 15 minutes représenterait ce type d'attaque enzymatique.

La seconde phase comprendrait l'hydrolyse des chaînes d'amylose et d'amylopectine de l'amidon moins accessibles. Cette attaque enzymatique, plus lente, serait représentée par les droites présentées dans ce rapport.

Si on compare à présent les droites d'activité, on observe que les extraits enzymatiques présentent des valeurs d'activités amylolytiques qui diffèrent en fonction



de l'âge de la fermentation dont ils sont issus. En effet, les taux moyens calculés d'amidon hydrolysé sont de 1,10 g/l/h et 2,5 g/l/h respectivement pour 4V et 24V, et de 1,57 g/l/h et 5,10 g/l/h respectivement pour 4T et 24T. Ceci confirme que la synthèse d'enzymes est corrélée à production de biomasse.

Nous observons également que les activités des extraits, issus de fermentations de même âge, croissent quand la concentration en amidon soluble initiale augmente. En effet, les taux moyens calculés d'amidon hydrolysé passent de 1,10 g/l/h pour 4V à 1,5 g/l/h pour 4T et passent de 2,51 g/l/h pour 24V à 5,10 g/l/h pour 24T. La quantité d'enzymes excrétées par les bactéries pourrait être ainsi fonction de la concentration en amidon soluble, puisque les fermentations ont été préparées de manière identique (mêmes inoculums, mêmes milieux mis à part la quantité d'amidon).

Le classement de ces pentes d'activité (voir tableau 1) permet d'estimer globalement quelles souches sont les plus amylolytiques:

4V		24V		4T		24T		Rangs cumulés
Rang	Souche	Rang	souche	rang	souche	rang	souche	
1	60	1	60	1	15	1	60	60: 9 pts
2	25	2	25	2	20	2	20	20: 8 pts (*)
3	15	3	9	3	9	3	6'	25: 13 pts
4	9	4	20	4	25	4	9	9: 14 pts
5	6'	5	6'	5	6'	5	25	15: 16 pts
6	-	6	15	6	60	6	15	6': 18 pts

Tab.1: Classement par pentes d'activité des souches 60, 20, 15, 25, 9, 6'.

(\*): Rangs cumulés seulement sur 24V, 4T et 24T.

La souche 60 semble la plus amylolytique parmi les 6 souches, suivie du groupe constitué des souches 9 et 25. La souche 20 pourrait faire partie de ce groupe car elle n'a pas été classée pour 4V mais il semble que ses valeurs d'activités mesurées soient proches de celles des souches 6' et 9 dont les pentes sont plus faibles que les souches 15, 25 et 60 dans 4V. Les souches les moins amylolytiques seraient la 15 et la 6'.

### 3-4-1-Conclusion:

Les mesures d'activité en fonction du temps ont montré que l'hydrolyse enzymatique de l'amidon se ferait en deux étapes quelque soit la souche étudiée dans cette expérience. Les souches lactiques acidifiantes 6', 9, 15, 20, 25 et 60 ont montré ainsi des qualités amylolytiques évidentes, mesurables mais différentes. La souche 60 semblerait avoir le potentiel le plus élevé et les souches 6' et 15, les potentiels les plus



bas.

Les mouûts de fermentations qui ont permis de préparer ces extraits ont été précédemment congelés à -20°C. Les enzymes ont donc été conservées pendant plusieurs jours à des pH de 3,8 quand il s'agissait de fermentation de 24 heures. En remontant le pH à 5,5, nous avons observé que les enzymes présentaient des activités amylolytiques assez significatives malgré un long séjour (1 mois) dans un milieu hostile comme ce milieu acide. Cette résistance des enzymes vis à vis de l'acidité peut donc susciter quelques interrogations quant à la conservation du produit. En effet, malgré le pH bas de notre boisson, les enzymes bactériennes excrétées au cours de la fermentation auront une activité potentielle, laissant un risque de dégradation de l'amidon et donc une non conservation de la boisson. Une pasteurisation finale du produit peut-elle suffire à inactiver ces enzymes?

### **3-5-Identification taxonomique:**

Les souches 6', 9, 15, 20, 25, 60 sélectionnées dans la phase 2, ont toutes été identifiées comme des bacilles gram +, catalase - et oxydase -. Ces caractères nous ont permis de choisir le test API 50 CHL de BIO-MERIEUX, spécifique des bactéries lactiques, pour identifier ces souches.

Les 6 bactéries lactiques amylolytiques ont toutes été identifiées comme des *Lactobacillus plantarum* (voir annexe A16). Les souches 20, 9 et 25 ont donné des réponses absolument identiques, les souches 6', 15 et 60 sont différentes entre elles et différentes des souches 20, 9, 25. On retrouve ici une analogie avec les capacités amylolytiques des souches étudiées précédemment. En effet, les souches 20, 9 et 25 ont présenté des capacités d'hydrolyse amylolytique voisines, ce qui peut être justifié maintenant par le fait qu'il s'agissent d'une seule et même souche.

La caractérisation du souchier pour sélectionner les meilleures souches amylolytiques et acidifiantes nous permet donc de retenir 4 souches distinctes (20, 60, 6' et 15). Les prochains travaux relatifs à notre projet seront réalisés en utilisant et en comparant les performances de ces 4 souches.

# *Conclusion*

#### 4-Conclusion:

Une collection de 54 souches "lactiques amylolytiques" a été isolée par le CIAT en Colombie et transmise par l'INRA (P. TAILLEZ, Station de Recherches Laitières, Jouy en Josas). Ces souches ont été repiquées sur gélose MRS amidon à l'INAPG où certaines boîtes ont présenté une hétérogénéité des morphologies coloniales. Les différents types morphologiques ont été purifiés, ce qui a porté à 65 le nombre de souches de la collection. Ces souches ont été caractérisées par le type de fermentation mis en oeuvre (homo- ou hétérolactique), la vitesse et l'importance de l'acidification, la vitesse de consommation de l'amidon soluble et le potentiel amylolytique dans le but d'en sélectionner quelques unes potentiellement intéressantes pour notre projet.

6 souches ont répondu aux critères recherchés. Ce sont les souches n° 6', 9, 15, 20, 25 et 60. Elles se caractérisent chacune par:

- un métabolisme homofermentaire,
- une vitesse d'acidification grande entre 4 et 7 heures de fermentation,
- un pH final bas après 24 heures de fermentation,
- une vitesse de consommation d'amidon importante entre 7 et 11 heures de fermentation,
- un temps faible nécessaire à la consommation de 10 g/l,
- un potentiel amylolytique très significatif.

La souche 60 aurait en particulier le potentiel amylolytique le plus élevé, suivie des souches 20, 25 et 9 dont les potentiels se valent, les souches 6' et 15 seraient enfin les moins intéressantes amylolytiquement.

Les 6 souches ont été identifiées par galeries API 50 CHL de BIO-MERIEUX comme des *Lactobacillus plantarum*, avec en particulier des profils identiques pour les souches 20, 25 et 9. Les potentiels amylolytiques proches de ces 3 souches indiqueraient qu'il s'agit d'une seule et même souche.

La caractérisation de ces 65 souches a donc permis de faire ressortir 4 souches (60, 20, 6', 15) potentiellement exploitables pour notre projet, d'après les critères de sélection proposés. La caractérisation de ces 4 souches sera poursuivie avec les manipulations suivantes, prévues courant Juillet 1995:

- étude des comportements des extraits enzymatiques des souches sur amidon cru de manioc, de pomme de terre, de maïs et de riz,
- étude des activités enzymatiques amylolytiques en fonction du pH,
- étude du type de voie technologique à utiliser pour concevoir notre boisson:  
voie 1: fermentation directe de l'amidon de manioc gélatinisé. Cette voie implique

la mise en oeuvre de bactéries lactiques capables à la fois d'hydrolyser l'amidon et de fermenter les produits d'hydrolyse.

voie 2: hydrolyse préalable de l'amidon de manioc suivie d'une fermentation lactique des produits d'hydrolyse.

Une caractérisation moléculaire des 65 souches sera également effectuée au cours du mois de Juin 1995.

## *Bibliographie*



**ALAZARD, D., RAIMBAULT, M.** (1994). Etude de la production d'acide lactique par des souches de bactéries lactiques amylolytiques. Rapport scientifique annuel 1993-1994: Valorisation des produits, sous-produits et déchets de la petite et moyenne industrie du manioc en Amérique Latine, opération n°2, p. 3.

**CERNING, J.** (1990). Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria, FEMS Microbiology Reviews, **87**, pp. 113-130.

**DE MAN, J. C., ROGOSA, M., SHARPE, M. E.** (1960). A medium for the cultivation of Lactobacilli, J. Appl. Bacteriol., **23**, pp. 130-135.

**DOELLE, H. W.** (1969). Bacterial Metabolism, Ed. H. W. DOELLE, Academic Press Inc., pp. 129 et 330.

**FIGUEROA, C.** (1995). Ropy lactic acid isolated of the sour cassava fermented starch, Letters in Applied Microbiology, (sous presse).

**FLORES C. J.** (1992). Caracterizacion enzimatica y bioquimica de la microflora bacteriana asociada a la fermentacion del almidon de yuca (Manihot Esculenta Crantz), Tesis de grado, Universidad del Valle, Facultad del Ciencias, Santiago de Cali, 82 p.

**OTENG-GYANG, K.** (1979). Etude de levures amylolytiques en vue de production de protéines d'organismes unicellulaires, Thèse de Doctorat 3ème cycle, Université Montpellier II, 120 p.

**WOOD, W. A.** (1961). The Bacteria, **2**, Metabolism, Eds. I. C. GUNSALUS & Y. I. STANIER, Academic Press Inc. p. 59.



# *Annexes*

N° des souches initiales	Souches utilisées pour la phase 1 (certaines sont purifiées)	Souches utilisées pour la phase 2 (certaines sont purifiées)	Souches utilisées pour la phase 3	Souches sélectionnées après identifications
1	1p, 1c	*	*	*
2	2p, 2cl, 2cll	*	*	*
3	3p, 3c	*	*	*
4	4, 4'	4, 4'	*	*
5	5	*	*	*
6	6, 6'	6, 6'	6'	6'
7	7	*	*	*
8	8p, 8c	*	*	*
9	9	9	9	*
10	10	*	*	*
11	11	11	*	*
12	12	12	*	*
13	13	13	*	*
15	15	15	15	15
17	17.1, 17.2	17.1a, 17.1b	*	*
18	18	*	*	*
19	19	*	*	*
20	20	20	20	20
22	22	*	*	*
23	23	23a	*	*
24	24	*	*	*
25	25	25	25	*
26	26	*	*	*
28	28b, 28c	*	*	*
31	31	31a, 31b	*	*
32	32	32a, 32b	*	*
33	33	*	*	*
34	34	34	*	*
35	35	35	*	*
38	38	38aa, 38ab, 38b	*	*
39	39	39	*	*
40	40	Levures donc éliminées	*	*
41	41	41	*	*
42	42	*	*	*
43	43	*	*	*
44	44	44	*	*
45	45	*	*	*
46	46	*	*	*
49	49	*	*	*
50	50	*	*	*
51	51l, 51b, 51c	*	*	*
52	52	*	*	*
52b	52b	*	*	*
53	53	*	*	*
54	54	*	*	*
55	55	55	*	*
56	56	56	*	*
57	57	*	*	*
58	58.1, 58.2	*	*	*
59	59	59	*	*
60	60	60	60	60
61	61	*	*	*
62	62	*	*	*
63	pas de croissance	*	*	*
Total = 54	Total = 65	Total = 30	Total = 6	Total = 4

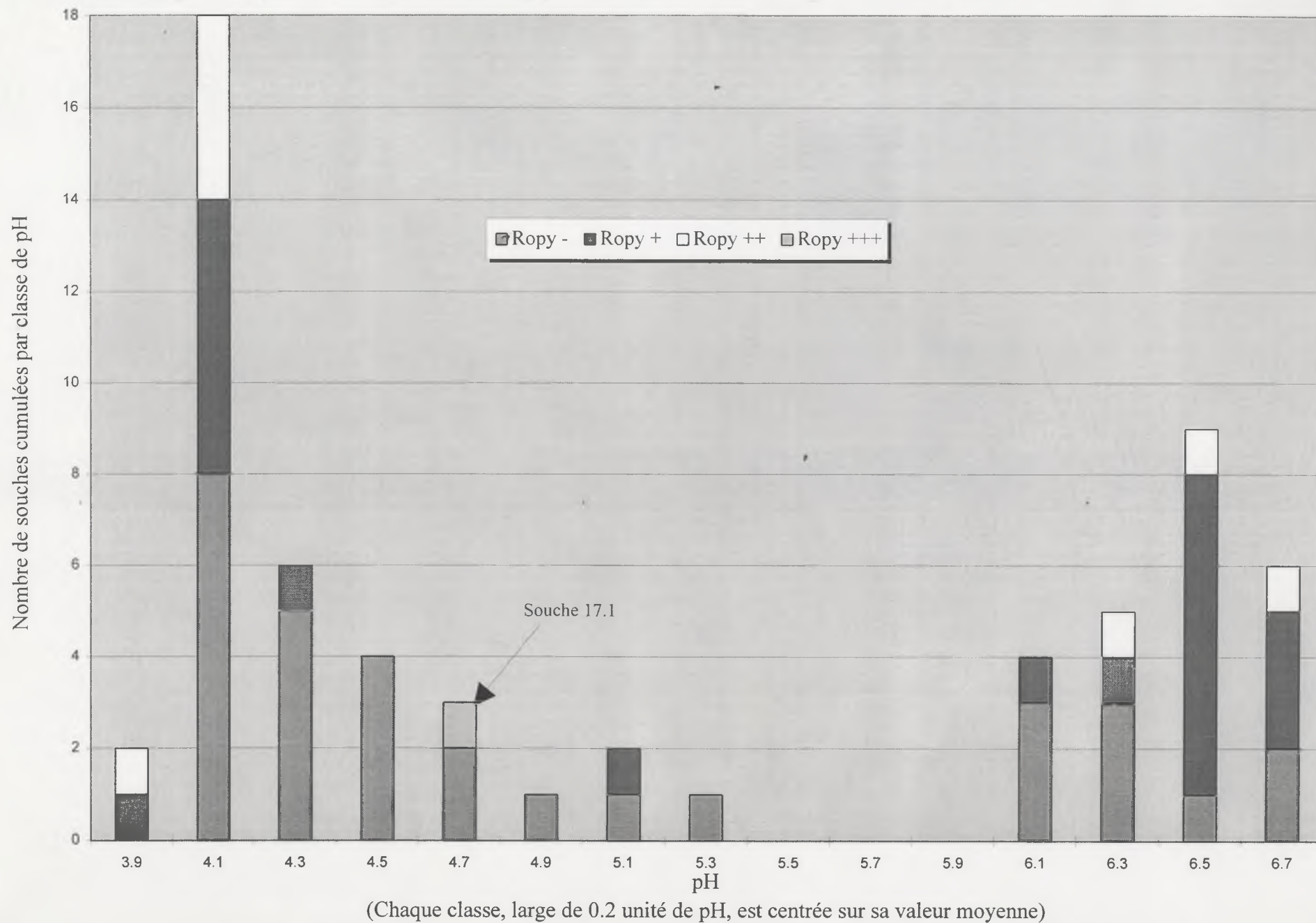


**Fermentations des souches sur milieu MRS amidon soluble, sur boîtes et sur bouillons**

n° de souche	Résultats boîtes de 24 H			Résultats bouillons de 18 H			n° de souche	Résultats boîtes de 24 H			Résultats bouillons de 18 H		
	Evaluation de la croissance	Tailles des colonies	Caractère ropy	pH après T	Gaz	Ethanol		Evaluation de la croissance	Tailles des colonies	Caractère ropy	pH après T	Gaz	Ethanol
58,2	(+++)	>2 mm	(+)	5,04	nd	*	28c	(++)	<0,5 mm	(+)	6,78	nd	*
19	(++)	<1 mm	(-)	4,86	nd	nd	2p	(++)	1 mm	(+)	6,52	nd	*
34	(++)	2 mm	(+)	4,12	nd	*	2c1	(++)	1 mm	(+)	6,53	nd	*
35	(++)	1 mm	(+)	4,13	nd	*	2c11	(++)	1 mm	(+)	6,54	nd	*
44	(++)	1 mm	(+)	4,11	nd	*	511	(++)	1 mm	(+)	6,11	nd	*
25	(+++)	2 à 3 mm	(+)	4,18	nd	*	51b	(++)	1 mm	(++)	6,25	nd	*
24	(++)	1 mm	(-)	4,69	nd	*	51c	(++)	1 mm	(+)	6,21	nd	*
15	(++)	3 mm	(+)	4,08	nd	*	8c	(+)	<0,5 mm	(+)	6,64	nd	*
31	(++)	1 à 2 mm	(-)	4,17	nd	*	8p	(+)	<0,5 mm	(++)	6,64	nd	*
38	(++)	1 à 3 mm	(-)	4,04	nd	nd	1p	(+)	<0,5 mm	(+)	6,64	nd	*
4	(++)	2 mm	(++)	4,02	nd	*	1c	(++)	<0,5 mm	(-)	6,56	nd	*
4'	(++)	2 mm	(++)	4,04	nd	*	45	(+)	<1 mm	(-)	6,19	nd	*
6	(++)	2 mm	(++)	4,05	nd	*	54	(+)	<1 mm	(-)	6,17	nd	*
6'	(++)	1 mm	(++)	4,04	nd	*	11	(++)	<0,5 mm	(-)	4,09	nd	*
57	(+)	<1 mm	(-)	4,45	nd	nd	12	(++)	<0,5 mm	(-)	4,1	nd	*
17,1	(+)	<1 mm	(+++)	4,69	nd	*	9	(++)	<0,5 mm	(+)	3,93	nd	*
17,2	(++)	1 mm	(-)	6,20	nd	*	41	(++)	<0,5 mm	(-)	4,07	nd	*
58,1	(+)	<1 mm	(-)	4,61	nd	*	46	(++)	<0,5 mm	(-)	5,27	nd	*
60	(++)	<0,5 mm	(-)	4,14	nd	*	5	(++)	<0,5 mm	(-)	5,16	nd	*
59	(++)	<0,5 mm	(-)	4,13	nd	nd	22	(++)	<0,5 mm	(-)	4,59	nd	*
20	(+++)	>1 mm	(++)	3,86	nd	*	62	(++)	<0,5 mm	(-)	4,31	nd	*
39	(++)	<0,5 mm	(-)	4,30	nd	*	55	(++)	<0,5 mm	(-)	4,29	nd	*
13	(++)	<1 mm	(+)	4,30	nd	*	42	(++)	<0,5 mm	(++)	6,55	nd	*
40	(++)	1 mm	(+)	4,02	nd	*	43	(++)	<0,5 mm	(-)	4,59	nd	*
23	(++)	<0,5 mm	(-)	4,28	nd	nd	56	(++)	<0,5 mm	(-)	4,18	nd	*
3c	(+++)	1 mm	(+)	6,50	nd	*	63	(++)	<0,5 mm	(-)	4,45	nd	*
3p	(+++)	1 mm	(+)	6,50	nd	nd	18	(+++)	<0,5 mm	(+)	6,42	nd	*
32	(++)	1 mm	(-)	4,27	nd	*	10	(++)	<0,5 mm	(+)	6,51	nd	*
49	(+)	<0,5 mm	(-)	6,03	nd	*	33	(+++)	1 mm	(-)	6,63	nd	nd
26	(++)	<0,5 mm	(-)	6,21	nd	nd	28b	(++)	<0,5 mm	(-)	6,63	nd	*
7	(+)	<0,5 mm	(-)	6,33	nd	nd							

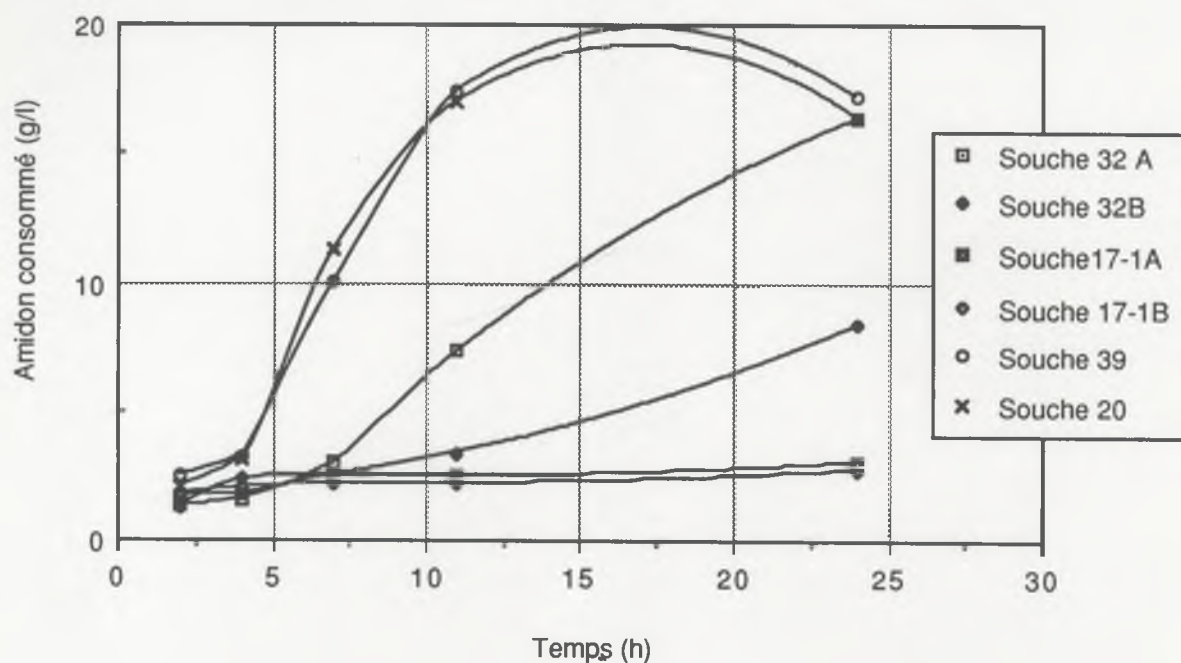
nd: non détectable.

# Etudes des pH de 61 souches après 18 heures de fermentations sur amidon soluble

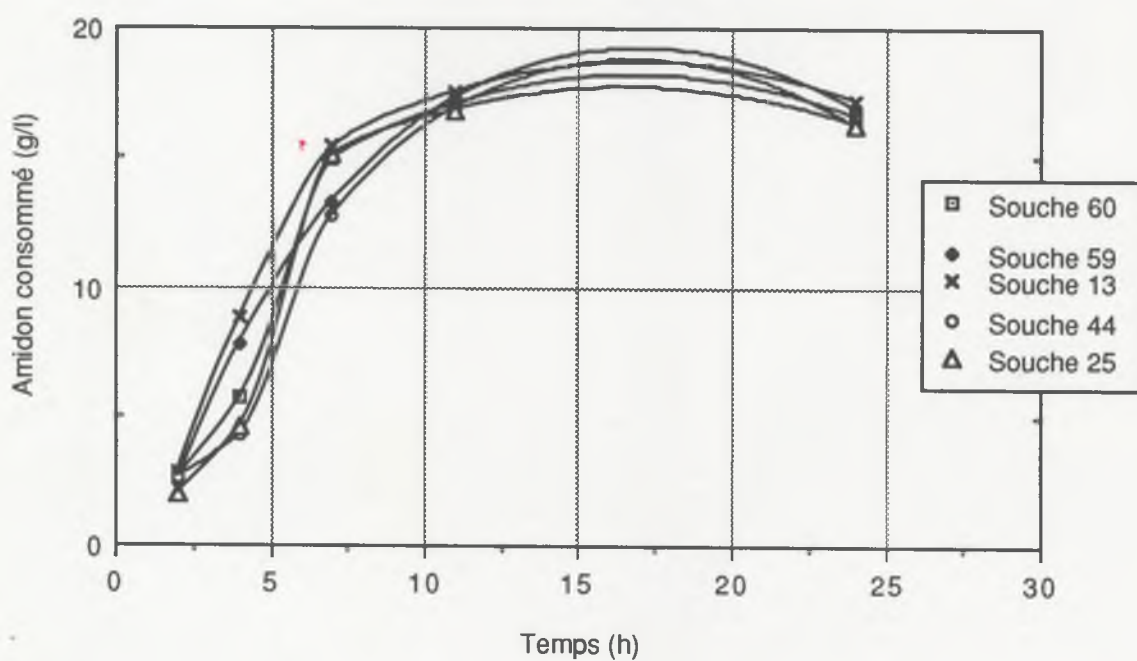




Consommation de l'amidon soluble  
des souches 32A, 32B, 17-1A, 17-1B, 39, 20

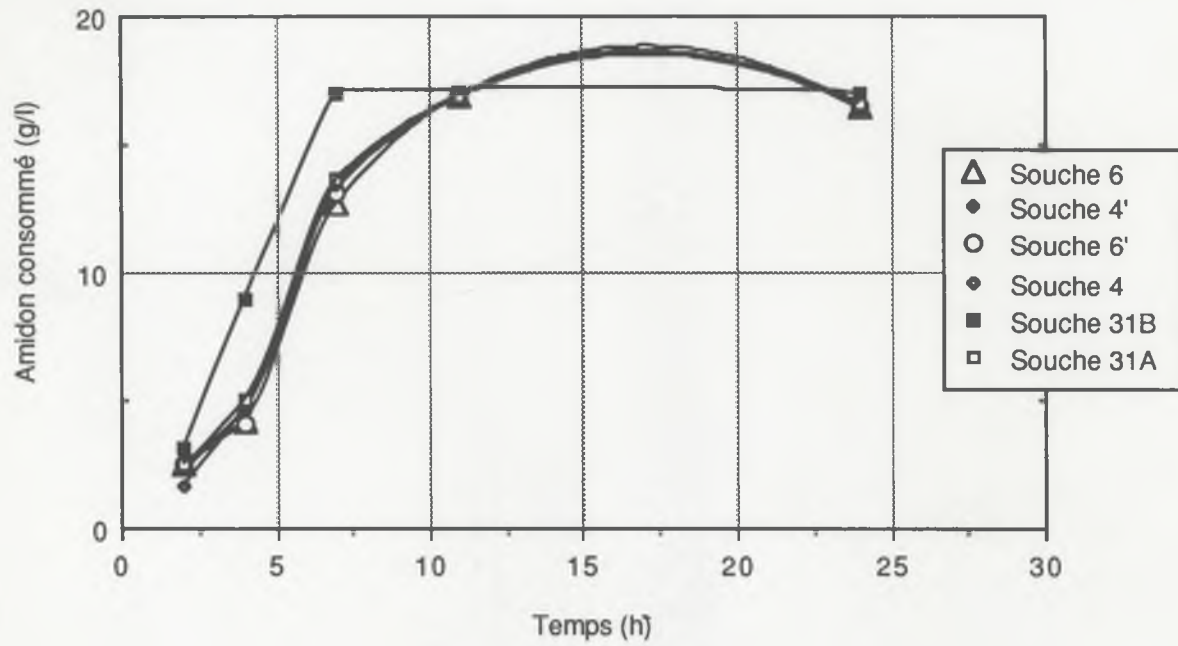


Consommation de l'amidon soluble  
des souches 60, 59, 13, 44, 25

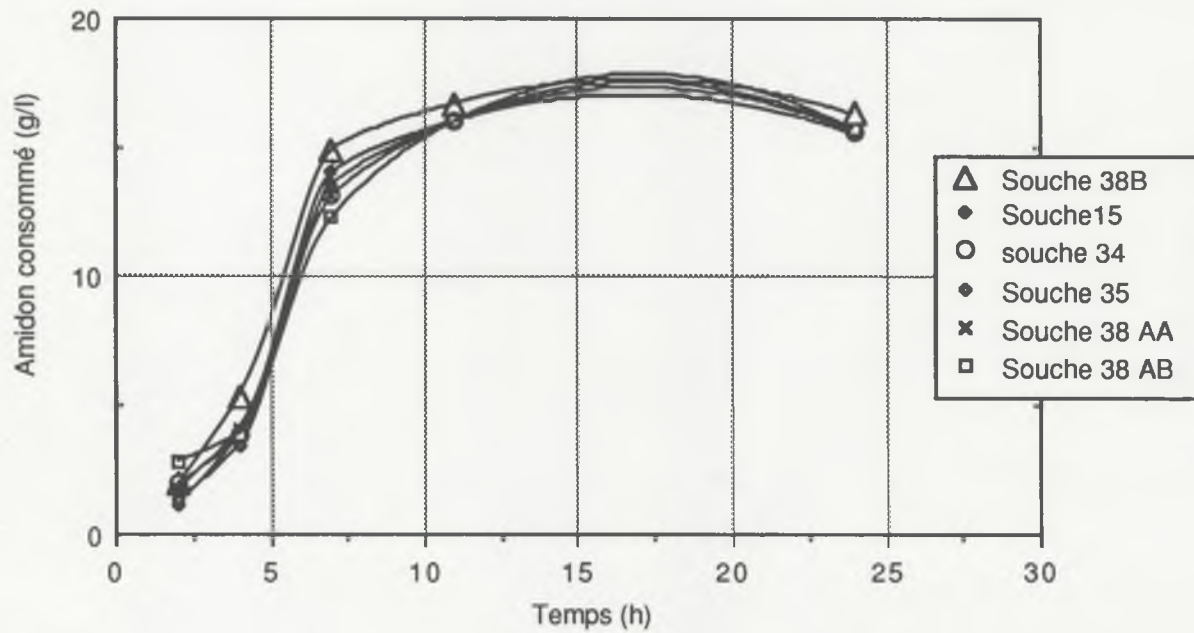




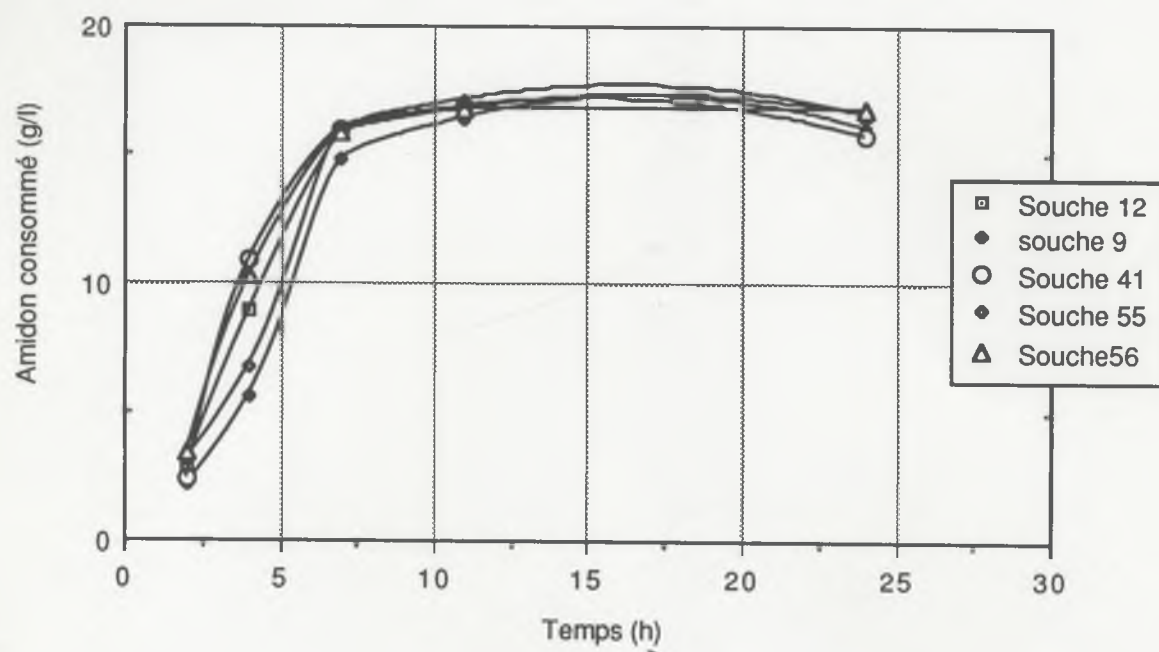
Consommation de l'amidon soluble  
des souches 6, 4', 6', 4, 31B, 31A



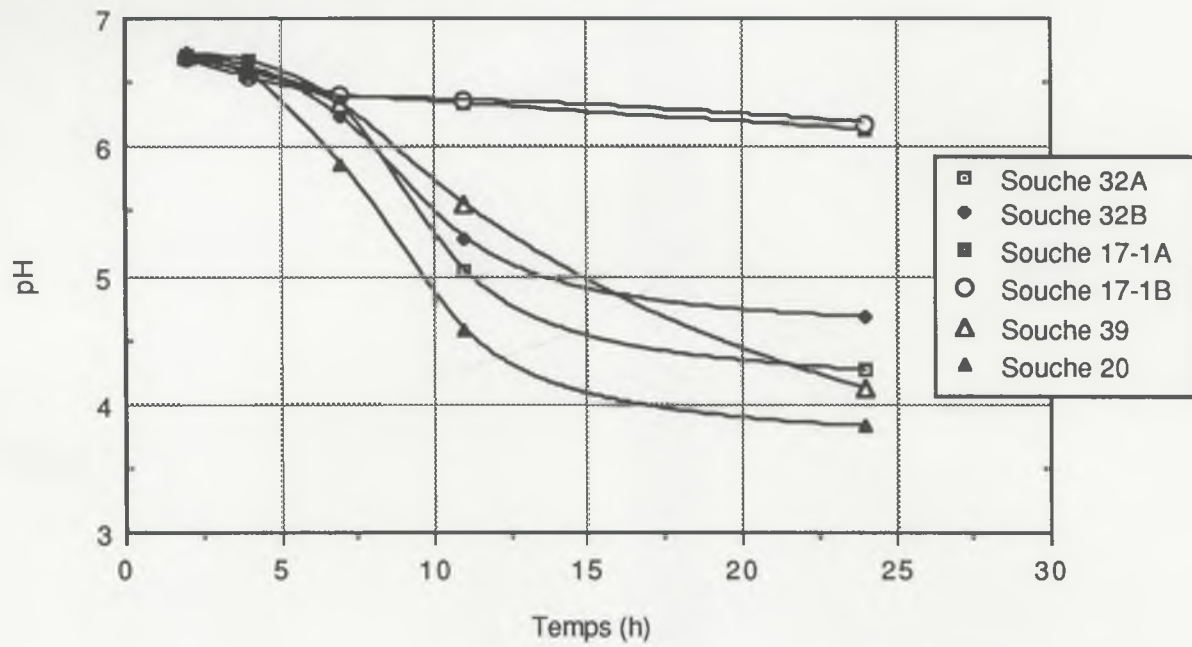
Consommation de l'amidon soluble  
des souches 38B, 15, 34, 38AA, 38AB



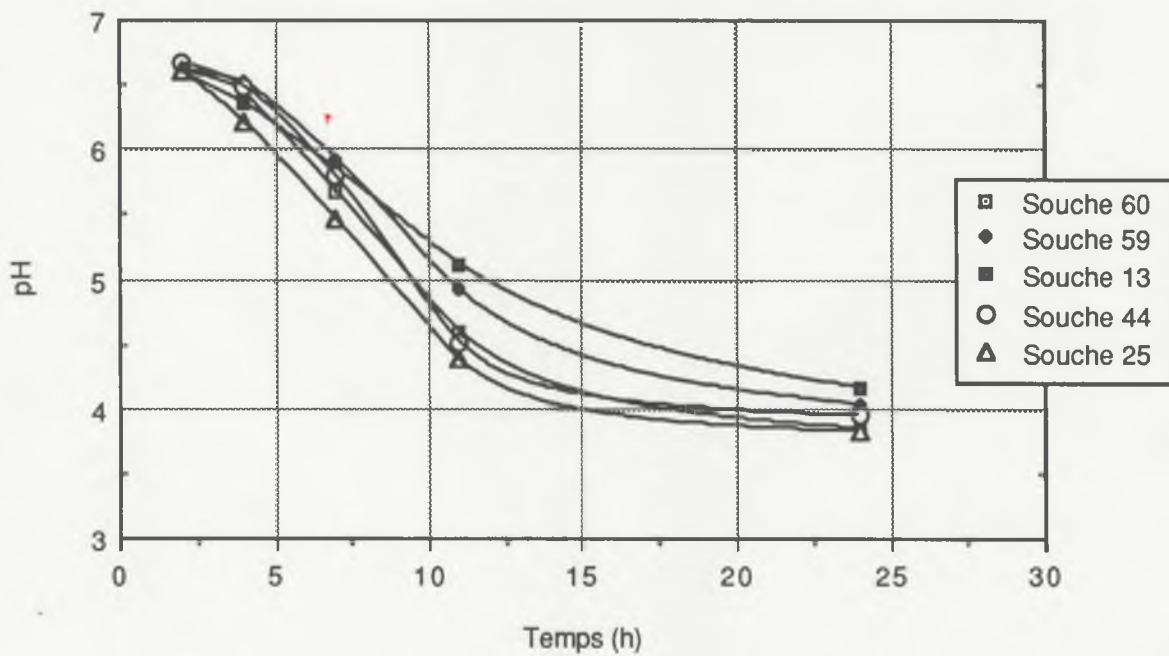
Consommation de l'amidon soluble  
des souches 12, 9, 41, 55, 56



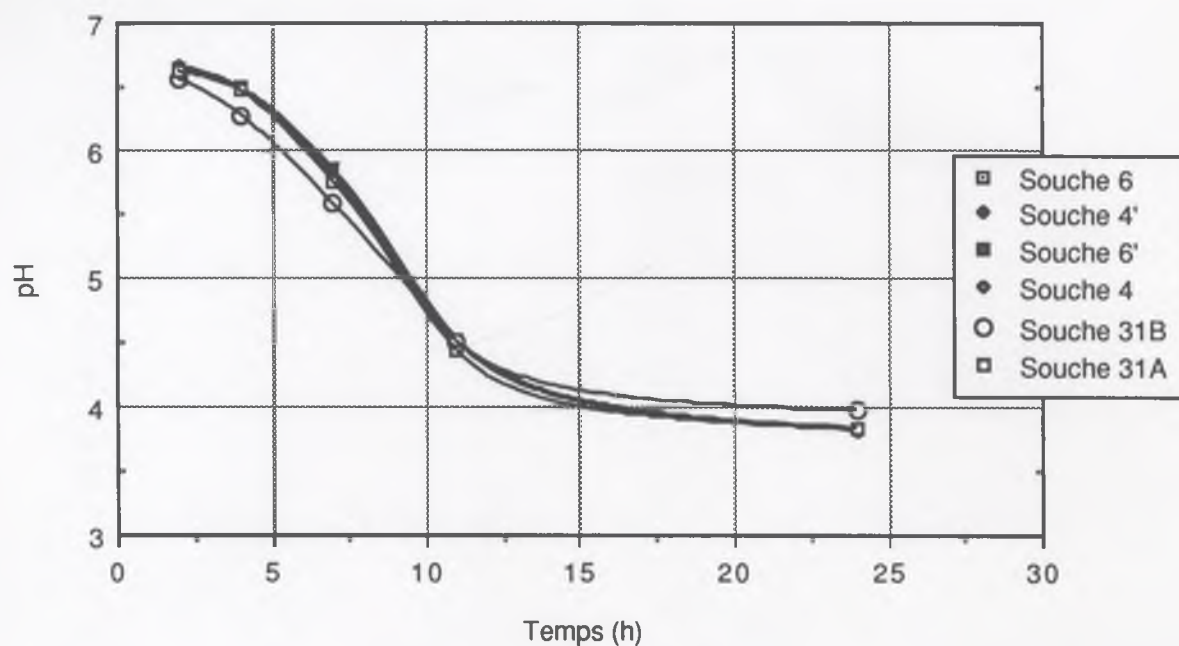
Acidification du milieu MRS amidon soluble  
par les souches 32A,32B,17-1A,17-1B,39,20



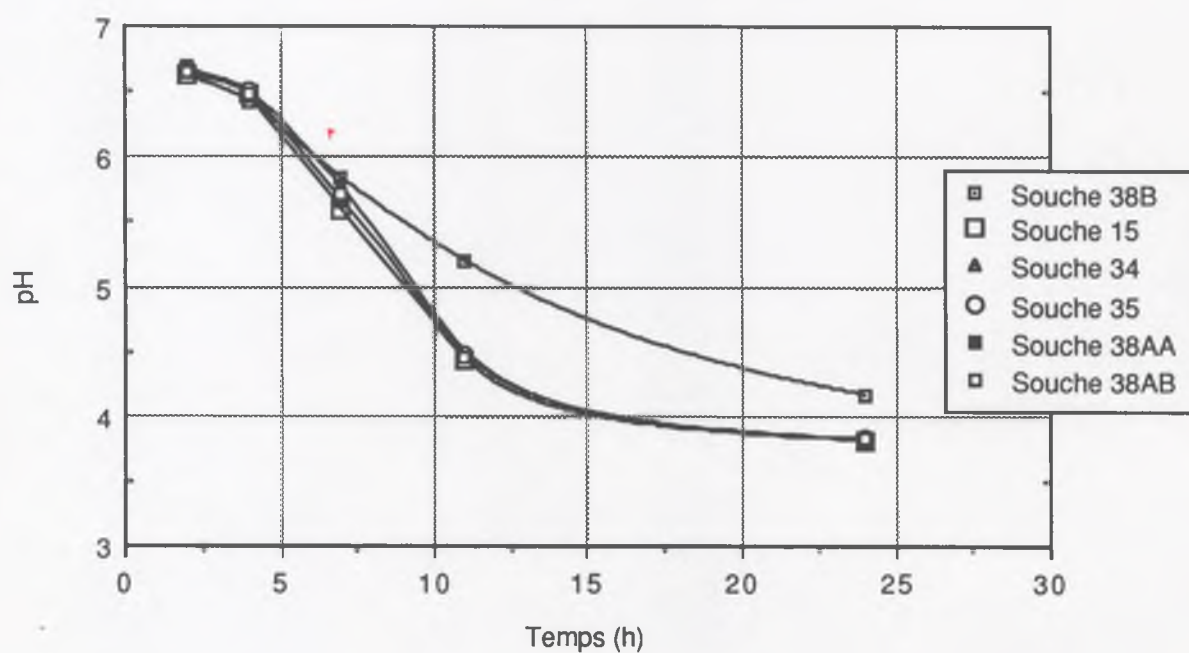
Acidification du milieu MRS amidon soluble  
par les souches 60, 59, 13, 44, 25



Acidification du milieu MRS amidon soluble  
par les souches 6, 4', 6', 4, 31B, 31A

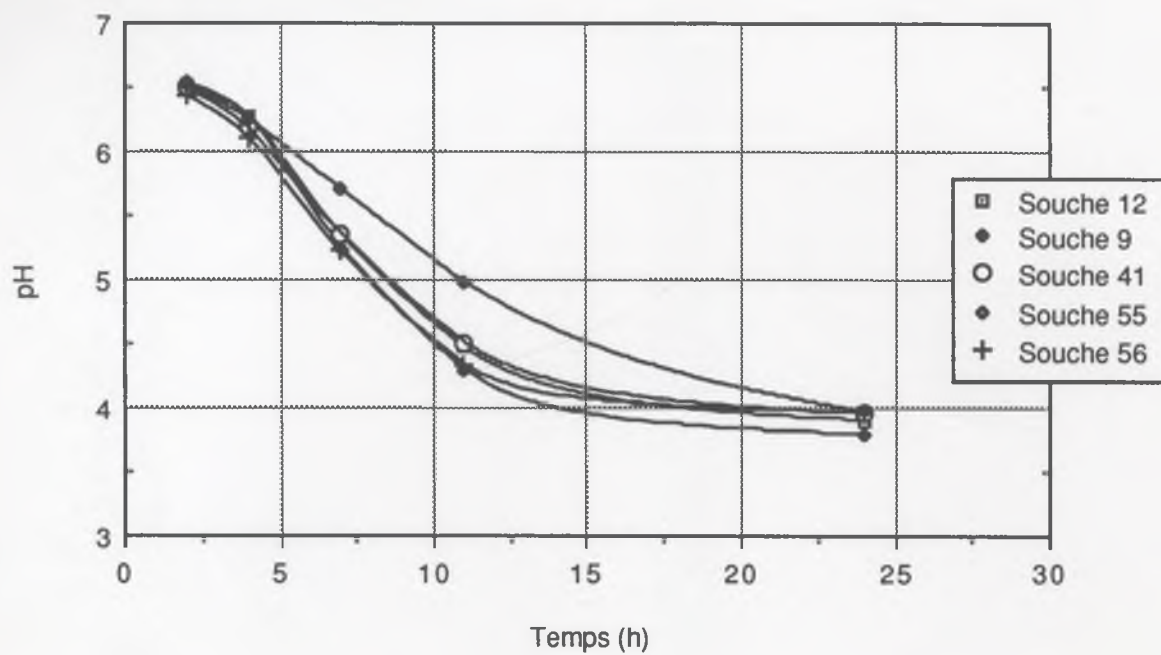


Acidification du milieu MRS amidon soluble  
par les souches 38B, 15, 34, 35, 38AA, 38AB





Acidification du milieu MRS amidon soluble  
par les souches 12, 9, 41, 55, 56



N° de souche	Groupe de la souche	Vitesse moyenne de consommation entre 4 et 7 heures de fermentation (g/l)	temps pour consommer 10 g. d'amidon (h)	Vitesse moyenne d'acidification entre 7 et 11 heures de fermentation (Unité de pH/h)	pH final
		(critère 1)	(critère 2)	(critère 3)	(critère 4)
32A	I	0,487	19,760	0,320	4,27
32B	I	0,065	122,330	0,235	4,67
17-1A	I	0,249	37,140	0,018	6,13
17-1B	I	0,048	170,040	0,008	6,18
39	I	2,266	6,974	0,195	4,12
20	I	2,709	6,528	0,323	3,82
60	II	3,073	5,404	0,270	3,85
59	II	2,937	5,772	0,253	4,04
13	II	2,200	4,542	0,183	4,17
44	II	2,851	6,022	0,320	3,95
25	II	3,526	5,548	0,273	3,82
6	III	2,847	6,037	0,333	3,84
4'	III	2,878	5,869	0,328	3,82
6'	III	3,030	5,972	0,333	3,84
4	III	2,906	5,800	0,323	3,82
31B	III	2,683	4,387	0,270	3,97
31A	III	2,890	5,728	0,330	3,86
38B	IV	3,200	5,463	0,160	4,16
15	IV	3,409	5,821	0,293	3,82
34	IV	3,090	6,003	0,318	3,82
35	IV	3,377	5,956	0,300	3,82
38AA	IV	3,004	5,971	0,305	3,83
38AB	IV	2,786	6,189	0,315	3,82
12	V	2,305	4,483	0,223	3,93
9	V	3,085	5,428	0,240	3,82
41	V	1,708	3,488	0,213	3,98
55	V	3,079	5,052	0,180	4,00
56	V	1,891	3,881	0,220	3,99

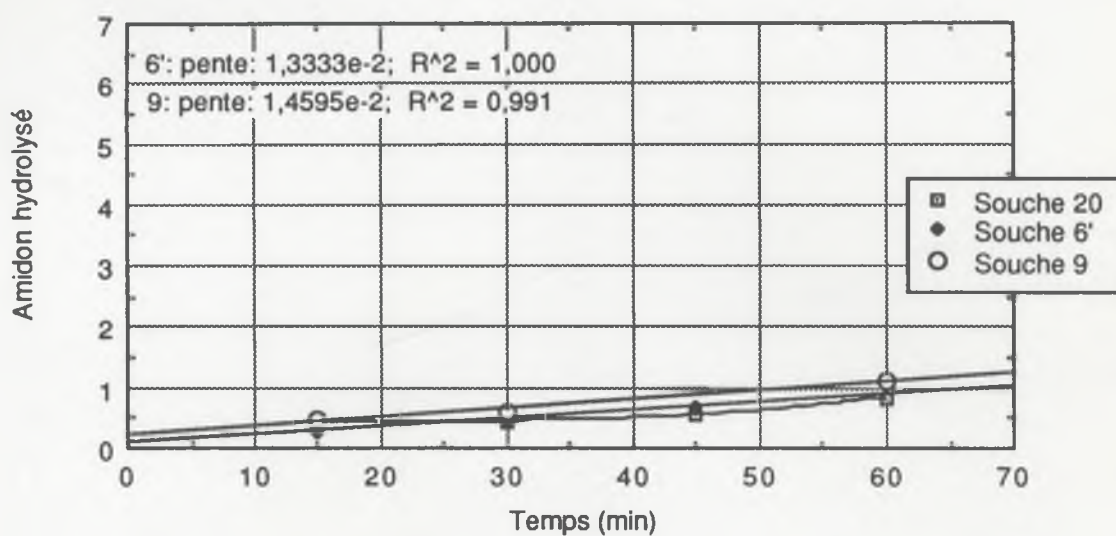
23A et 11 n'ont pas poussé lors de la préparation des inoculum pour les fermentations



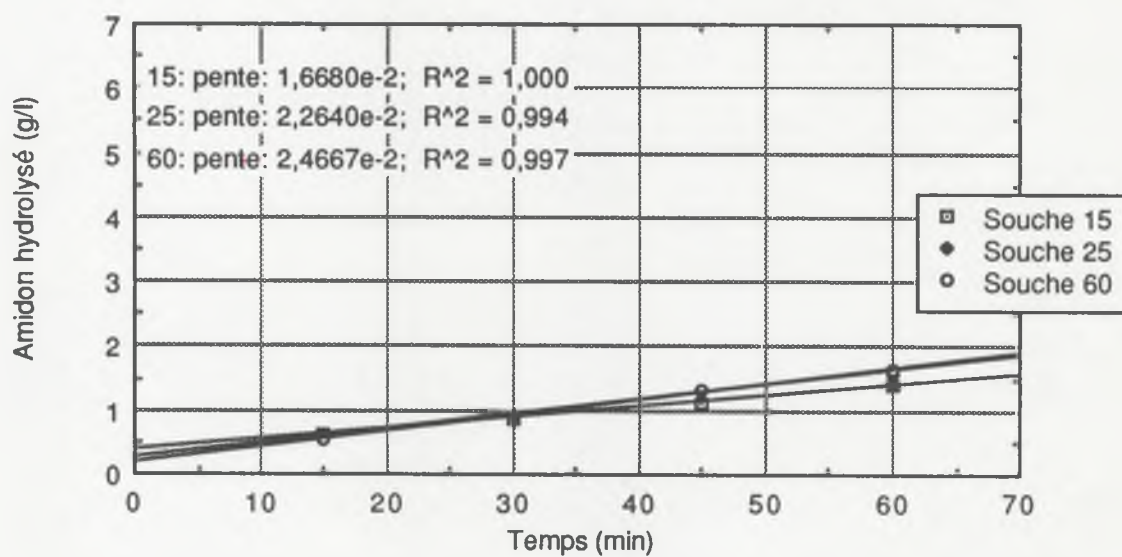
Groupe I				Groupe IV			
Critère	Classes	Point(s)	Souches concernées	Critère	Classes	Point(s)	Souches concernées
1	0,065 à 0,946	1	32a, 32b, 17.a, 17.b	1	2,786 à 2,994	1	38 ab
	0,946 à 1,828	2			2,994 à 3,201	2	38b, 34, 38aa
	1,828 à 2,709	3	39, 20		3,201 à 3,409	3	15, 35
2	6,582 à 61,03	3	39, 20, 17.a, 32a	2	5,463 à 5,705	3	38b
	61,03 à 115,54	2			5,705 à 5,947	2	15
	115,54 à 170,04	1	32b, 17.1b		5,947 à 6,189	1	34, 35, 38aa, 38ab
3	0,008 à 0,113	1	17.1a, 17.1b	3	0,160 à 0,213	1	38b
	0,113 à 0,218	2	39		0,213 à 0,265	2	
	0,218 à 0,323	3	32a, 32b, 20		0,265 à 0,318	3	15, 34, 35, 38aa, 38ab
4	3,82 à 4,61	3	20, 32a, 39	4	3,82 à 3,93	3	15, 34, 35, 38aa, 38ab
	4,61 à 5,39	2	32b		3,93 à 4,04	2	
	5,39 à 6,18	1	17.1a, 17.1b		4,04 à 4,16	1	38b
Groupe II				Groupe V			
Critère	Classes	Point(s)	Souches concernées	Critère	Classes	Point(s)	Souches concernées
1	2,200 à 2,642	1	13	1	1,708 à 2,167	1	41, 56
	2,642 à 3,084	2	60, 59, 44		2,167 à 2,626	2	12
	3,084 à 3,526	3	25		2,626 à 3,085	3	9, 55
2	4,542 à 5,035	3	13	2	3,489 à 4,134	3	41, 56
	5,035 à 5,529	2	60		4,134 à 4,781	2	12
	5,529 à 6,022	1	59, 44, 25		4,781 à 5,428	1	9, 55
3	0,185 à 0,230	1	13	3	0,18 à 0,20	1	55
	0,230 à 0,275	2	60, 59, 25		0,20 à 0,22	2	41, 56
	0,275 à 0,32	3	44		0,22 à 0,24	3	12, 9
4	3,82 à 3,94	3	60, 25	4	3,82 à 3,88	3	9
	3,94 à 4,05	2	59, 44		3,88 à 3,94	2	12
	4,05 à 4,17	1	13		3,94 à 4,00	1	41, 55, 56
Groupe III							
Critère	Classes	Point(s)	Souches concernées				
1	2,683 à 2,799	1	31b				
	2,799 à 2,914	2	6, 4', 4, 31a				
	2,914 à 3,030	3	6'				
2	4,387 à 4,937	3	31b				
	4,937 à 5,487	2					
	5,487 à 6,037	1	6, 4', 6', 4, 31a				
3	0,27 à 0,291	1	31b				
	0,291 à 0,312	2					
	0,312 à 0,333	3	6, 4', 6', 4, 31a				
4	3,82 à 3,87	3	6, 4', 6', 4, 31a				
	3,87 à 3,92	2					
	3,92 à 3,97	1	31b				

	Nombre de points obtenus par souches								
	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Groupe I	17.1b		17.1a	32b			32a	39	20
Groupe II			13	59	44	60, 25			
Groupe III			31b			6,4', 4, 31a	6'		
Groupe IV				38b	38ab	38aa, 34	35	15	
Groupe V			55	41, 56		12	9		

Mesure de l'activité enzymatique amylolytique des souches 20, 6', 9  
(Extraits enzymatiques 4V)

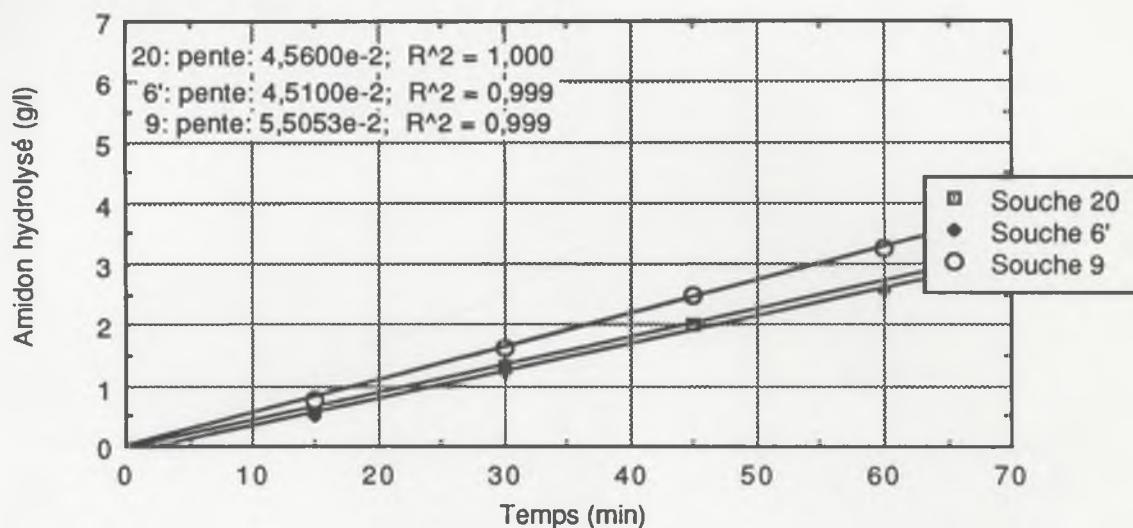


Mesure de l'activité enzymatique amylolytique des souches 15, 25, 60  
(Extraits enzymatiques 4V)

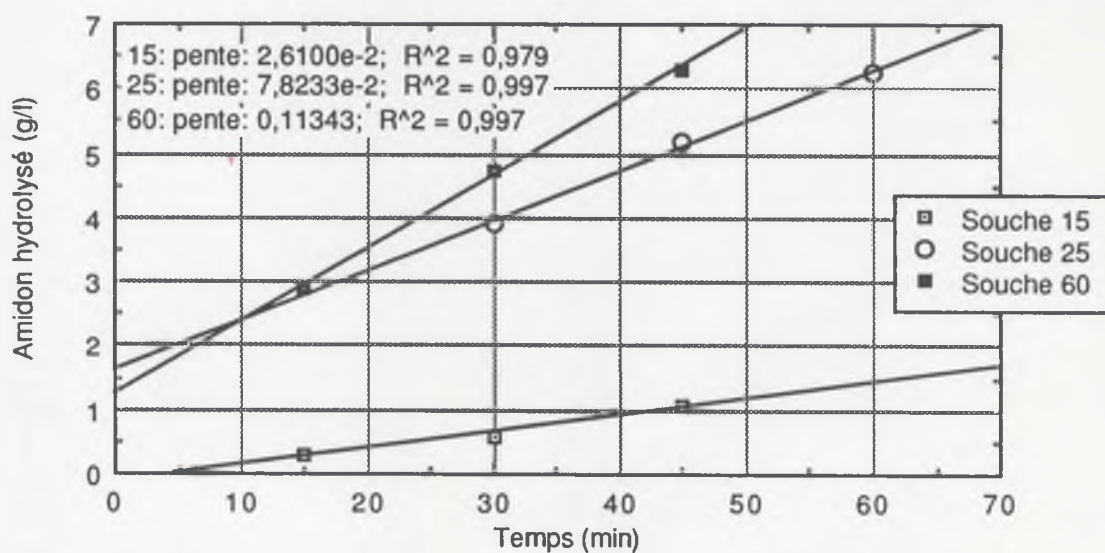




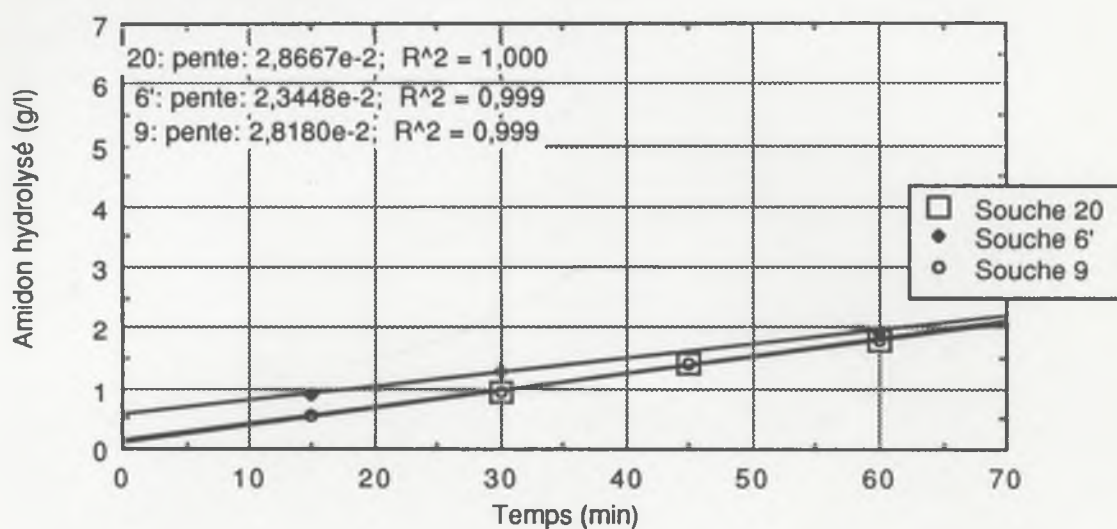
Mesure de l'activité enzymatique amylolytique des souches 20, 6', 9  
(Extraits enzymatiques 24V)



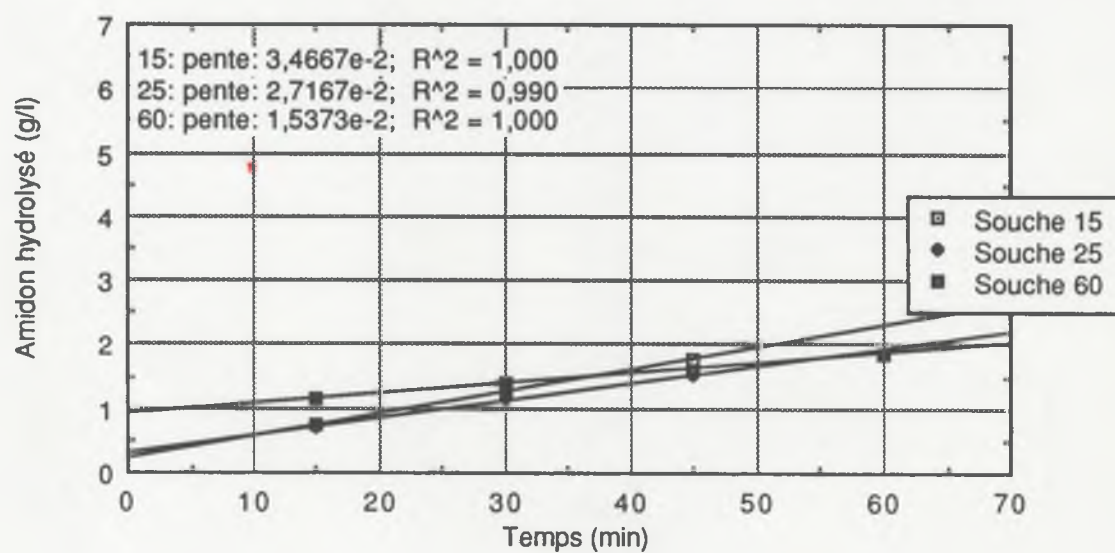
Mesure de l'activité enzymatique amylolytique des souches 15, 25, 60  
(Extraits enzymatiques 24V)



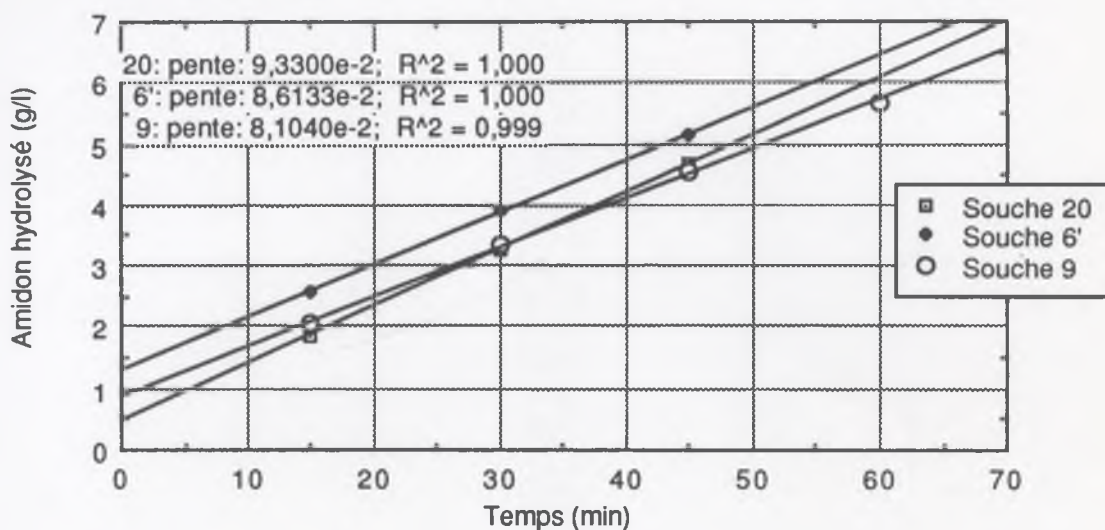
Mesure de l'activité enzymatique amylolytique des souches 20, 6', 9  
(Extraits enzymatiques 4 T)



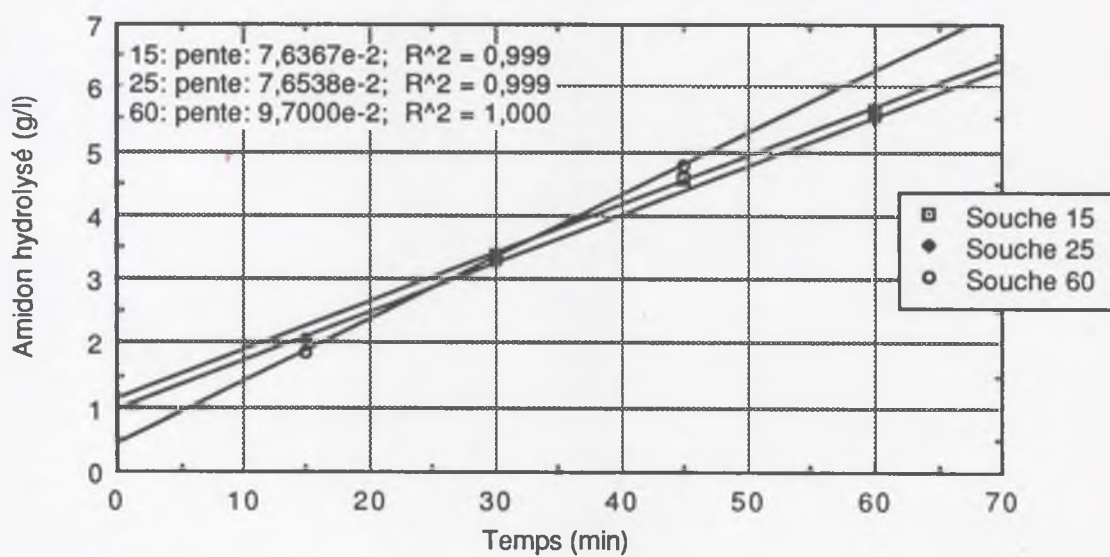
Mesure de l'activité enzymatique amylolytique des souches 15, 25, 60  
(Extraits enzymatiques 4T)



Mesure de l'activité enzymatique amylolytique des souches 20, 6', 9  
(Extraits enzymatiques 24T)



Mesure de l'activité enzymatique amylolytique des souches 15, 25, 60  
(Extraits enzymatiques 24T)





Tests d'identification Bio-Mérieux API50 CHL

n° de souche	Identification	% identification	Typification	Tests à l'encontre	
20	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,9	0,66	D-Sorbitol	78%
				Glycogène	7%
				Amidon	7%
25	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,9	0,66	D-Sorbitol	78%
				Glycogène	7%
				Amidon	7%
9	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,9	0,66	D-Sorbitol	78%
				Glycogène	7%
				Amidon	7%
60	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,9	0,52	D-Sorbitol	78%
				Glycogène	7%
				Amidon	7%
				Tréhalose	96%
6'	<i>Lactobacillus plantarum</i>	90,3	0,24	D-Sorbitol	78%
				Glycogène	7%
				Amidon	7%
				Tréhalose	96%
				Mélibiose	94%
				Arbutine	99%
15	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,9	0,33	D-Sorbitol	78%
				Glycogène	7%
				Amidon	7%